

19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT



Wirtschaftspatent

Erteilt gemaeß § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

1567 14

Int.Cl.³ 3(51) C 12 N 9/52

MIT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

:1) WP C 12 N/ 2279 65 8

(22) 02.03.81

(44) 15.09.82

- 1) AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR, BERLIN;DD;
2) KOERNER, DIETER,DIPL.-ING.;KRETSCHMER, SIGRID,DR. DIPL.-BIOLOG.;
JACOB, HANS-EGON,DR. DIPL.-FORSTING.;KLINGENBERG, PETER,DR. DIPL.-BIOLOG.;DD;
VON LUPIN, INGEBORG,STROHBACH, GUENTHER,DR. DIPL.-BIOLOG.;
RUTTLUFF, HEINZ,PROF. DR. DIPL.-LEBENSMITTELCHEM.;DD;
3) siehe (72)
4) ADW DER DDR, ZI FUER ERNAEHRUNG, PATENTBUERO, 1505 BERGHOLZ-REMBRUECKE,
SCHEUNERT-ALLEE 114/116

4) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON THERMITASE

7) Die Erfindung bezieht sich auf die Herstellung einer thermophilen Protease aus Thermoactinomyces jigaris. Thermitase wird eingesetzt zur Klebererweichung bei der Naehrmittel-, Waffel- und Backwarenherstellung, der Swinnung von Protein-Partialhydrolysaten und anderen Prozessen. Das Verfahren besteht darin, daß man zur Okultivierung eine eingesetzte mit Sauerstoff gesättigte Naehrloesung mit Sporen beimpft und die Auskeimung im aeratisch verschlossenen Gefaess bei Absinken des Sauerstoffpartialdruckes auf 20 bis 40% des Sauerstoffpartialdruckes bei Saettigung vornimmt den gewuenschten Sauerstoffpartialdruck aufrecht erhaelt, die Vorkultur in einen Fermenator mit dem Produktionsmedium ueberfuehrt und die Fermentation durchfuehrt, wobei man dabei eltere Mengen von Naehrstoffen zufuehrt.

BEST AVAILABLE COPY

227965 8

Erfinder: Dieter Körner
Dr. Sigrid Kretschmer
Dr. Hans-Egon Jacob
Dr. Peter Klingenberg
Ingeborg von Lupin
Dr. Günther Strohbach
Prof. Dr. Heinz Rutloff

Verfahren zur Herstellung von Thermitase

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer thermophilen Protease aus *Thermoactinomyces vulgaris* mit speziellen Eigenschaften zur partiellen Hydrolyse von tierischen und pflanzlichen Proteinen. Das entstehende Enzym Thermitase ist geeignet, als Rohpräparat oder in teilgereinigter Form bei verschiedenen Prozessen in der Lebensmittelindustrie sowie hochgereinigt als Biofeinchemikalie eingesetzt zu werden. Applikationsgebiete sind die Klebererweichung bei der Nährmittel-, Waffel- und Backwarenherstellung, die Gewinnung von Protein-Partialhydrolysaten für bestimmte Zielgruppen, zum Beispiel für diätetische Zwecke bzw. für die Ernährung von Kranken und Rekonvaleszenten. Das Verfahren zur Herstellung von Thermitase ist für die großtechnische Produktion des Enzyms in Rührfermentoren geeignet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß zahlreiche Mikroorganismen, z. B. solche der Gattung *Aspergillus*, *Bacillus* und *Streptomyces*, unter den jeweils erforderlichen Kulturbedingungen Proteasen produzieren, die sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften voneinander unterscheiden. Für verschiedene Anwendungszwecke ist es vorteilhaft, wenn die Aktivität des Enzyms auch oder aber vorrangig bei höherer Temperatur wirksam ist. Es ist weiter bekannt, daß durch die Kultivierung von *Thermoactinomyces vulgaris* auf geeigneten Nährsubstraten eine thermophile Protease erzeugt werden kann, deren Temperaturoptimum bei 60 - 70 °C liegt und die eine weitgehend unspezifische und damit tiefgreifende Spaltung tierischer und pflanzlicher Proteine bewirkt.

Der bekannte Stamm zur Herstellung von Thermitase von der Art *Thermoactinomyces vulgaris* sowie eine Mutante desselben sind in der Zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena unter IMET 9512 und IMET 9515 hinterlegt. Die Charakteristik des Stammes und seine Kultivierung zum Zweck der submersen Gewinnung von Thermitase sind im WP 112 662 beschrieben. In einem Zusatzpatent WP 117 083 ist das Verfahren in der Weise verbessert worden, daß Zusätze von Rapsöl, Trockenhefe und Essigsäure zu Nährmedium zu einer Erhöhung der Enzymausbeute führen.

Die Reproduzierbarkeit der bekannten Verfahren ist jedoch unbefriedigend, da die Auskeimung der als Inoculum verwendeten Mikroorganismensporen in der verwendeten Vorkultur (Schüttelkultur) stark von den hydrodynamischen Bedingungen abhängt und bezüglich der Keimungsrate differiert. Dadurch treten im Produktionsmedium häufig Wachstumsverzögerungen auf, die von ungenügender Produktbildung und einer Vergrößerung der Infektionsgefahr begleitet sind.

Es ist bekannt, daß das unterschiedliche Verhalten bei der,

227965 8

3

Sporenkeimung durch die Abhängigkeit des Vorganges vom CO_2 -Gehalt im Kulturmedium hervorgerufen wird. Wie Kretschmer und Jacob ("Carbon dioxide requirement for outgrowth of Thermoactinomyces vulgaris spores" in Modarski, M.; W. Kurylowicz and J. Jeljaszewicz (Hrsg.) "Nocardia and Streptomyces", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York, 1978) fanden, erfolgt das Auswachsen der Keimschläuche nur in Anwesenheit von CO_2 , das sich jedoch wegen der erforderlichen Belüftung der Kulturen nur sporadisch in erforderlicher Konzentration anreichern kann. Auch unter Verwendung der im WP 117 083 genannten Zusätze zum Kulturmedium ist die Enzymausbeute mit 6 TE/ml Kulturmedium aus ökonomischer Sicht hinsichtlich Herstellung und Applikation noch zu niedrig. Die Aktivitätsangabe erfolgt in Tyrosin-Einheiten (TE), wobei gemäß TGL 29 166/02 1 TE derjenigen Enzymmenge entspricht, die aus einer 0,625 %igen Caseinlösung bei pH 8,0 und 55 °C so viel in 4 %iger Trichloressigsäurelösung lösliche Caseinbruchstücke je 1 min freisetzt, welche der Absorption (274nm) von 1 μMol Tyrosin entsprechen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, die genannten Nachteile der bekannten Verfahren durch eine reproduzierbare Keimung sowie durch rasches und kräftiges Wachstum des Organismus zu vermeiden, um damit zugleich eine Steigerung der Proteaseausbeute herbeizuführen, und einen großtechnisch sicher beherrschbaren Fermentationsprozeß zu gewährleisten, so daß unter industriellen Bedingungen die Ökonomie des Verfahrens verbessert wird.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Thermitase zu entwickeln, das ein reproduzierbares Wachstum des Mikroorganismus mit vergrößer-

227965 8

4

ten Biomasseausbeuten sowie hoher Enzymsyntheseleistung gewährleistet.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Thermitase durch Anzucht, Vorkultivierung und Kultivierung von Mikroorganismen des Stammes *Thermoactinomyces vulgaris* und/oder seiner Mutante - hinterlegt in der zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena unter IMET 9512 und für die Mutante IMET 9515 - wird in der Weise vorgegangen, daß man zur Vorkultivierung eine eingesetzte mit Sauerstoff gesättigte Nährlösung mit Sporen beimpft und die Auskeimung im hermetisch verschlossenen Gefäß bei Absinken des Sauerstoffpartialdruckes auf 20 bis 40 % des Sauerstoffpartialdruckes bei Sättigung, vorzugsweise auf 30 %, vornimmt, den gewünschten Sauerstoffpartialdruck bis zur vollständigen Auskeimung der Sporen durch Einleiten von Luft aufrecht erhält, die Vorkultur danach in einen Fermentor mit dem Produktionsmedium überführt und die Fermentation durchführt, wobei man während der Fermentation weitere Mengen von Nährstoffen zuführt.

Als Produktionsmedium werden vorzugsweise Maisstärke, Maisquellwasser, Trockenhefe, Magermilchpulver, Natriumchlorid und Kalziumchlorid eingesetzt. Vorteilhaft ist es, wenn man Stärkehydrolysat und/oder Maisquellwasserhydrolysat verwendet. Für die Vorkultivierung, d. h. die vollständige Auskeimung, ist es sehr effektiv, den nach dem Absinken erreichten Sauerstoffpartialdruck im Vorkulturgefäß 2 bis 4 h, vorzugsweise 2 h, beizubehalten. Für die eigentliche Produktion hat es sich als sehr zweckmäßig erwiesen, daß man während der Fermentation Maisstärke oder Stärkehydrolysate und/oder Maisquellwasser oder Maisquellwasserhydrolysate in einer solchen Menge zuführt, die dem Doppelten bis 1,5fachen der Menge des Ausgangsnährmediums entspricht. Die Nährstoffe können dabei kontinuierlich oder in Etappen zugeführt werden, wobei man 2 bis 6 h, vorzugsweise 2 h, nach Überführung der Vorkul-

227965 8

5

tur in den Fermentor beginnt. Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß die Keimung der als Inoculum verwendeten Sporen reproduzierbar und zu 100 % in einem hermetisch abgeschlossenen Kulturgefäß unter Ausschaltung von Begasungseinflüssen erfolgt.

Im einzelnen geht man zweckmäßigerweise so vor, daß je nach benötigter Inoculummenge ein Rührgefäß, vorzugsweise ein Glaskolben mit Magnetrührer oder ein Rührfermentor, mit Nährlösung gefüllt und sterilisiert wird. Das Gefäß ist mit einer Sonde zur Messung des Sauerstoffpartialdruckes sowie mit einer Regulierung für die Zugabe von Luft ausgestattet. Vor der Beimpfung mit Sporen, vorzugsweise mit $10^7 - 10^8$ Sporen/ml Nährlösung, wird die Nährlösung durch Einleiten von Luft mit Sauerstoff gesättigt. Nach der Beimpfung wird das Gefäß hermetisch verschlossen. Die eingesetzten Sporen beginnen sofort zu atmen und produzieren dabei CO_2 , das sich infolge des fehlenden Gasaustausches mit der Umgebung in der Nährlösung anreichert. Innerhalb von 30 - 60 min wachsen dabei die Keimschläuche aus und es schließt sich unmittelbar die logarithmische Entwicklungsphase an. Um O_2 -Limitation zu vermeiden und die Anpassung der Vorkultur an die nachfolgende belüftete Fermentationsstufe zu gewährleisten, ist es erforderlich, den Sauerstoffpartialdruck nach Erreichen von 20 bis 40 % des Sauerstoffpartialdruckes bei Sättigung (Anfangswert), vorzugsweise von 30 %, bis zu einer Zeit von 2 h bis 4 h auf diesem Niveau zu halten. Nach etwa 2 h bis 4 h sind die Sporen 100 %ig ausgekeimt und weisen bereits lange, teilweise verzweigte Keimschläuche auf, so daß die Vorkultur in das Produktionsmedium überführt werden kann.

Es hat sich gezeigt, daß diese Methode der Vorkulturführung wesentlich für eine hohe Reproduzierbarkeit ist und daß im Fermentor ein Wachstums- und Enzymsbildungsprozeß einheitlich und äußerst effektiv abläuft.

Die Messung des Sauerstoffpartialdruckes während der Kei-

227965 8

6

mung gestattet Aussagen über den Verlauf dieses Vorganges und dient somit einer sicheren Kontrolle (Fig. 1 zeigt die Keimbildungsrate in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck). Die Nährlösung für die Durchführung der Keimung enthält Maisstärke oder Stärkehydrolysate, Maisquellwasser oder daraus hergestellte Hydrolysate, NaCl sowie CaCl₂. Vorteilhaft ist eine Zusammensetzung aus Stärkehydrolysat, Maisquellwasserhydrolysat, NaCl und CaCl₂, da es keine unlöslichen Bestandteile enthält und somit eine exakte mikroskopische Kontrolle des Keimungsablaufes gestattet.

Die Enzymausbeute bei der Herstellung von Thermitase wird entscheidend durch den Wachstumsprozeß, d. h. durch die Menge an gebildeter Biomasse sowie durch die stoffwechselphysiologischen Verhältnisse im Stadium der Enzymsynthese bestimmt. So wird bei dem Verfahren gemäß WP 117 083 eine Enzymaktivität von 6 TE je ml Kulturmedium infolge Limitation der C- und N-Quellen nicht überschritten, da nach 3 bis 6 h Fermentationsdauer die für Wachstum und Enzymbildung erforderliche Konzentration dieser Substanzen nicht mehr gegeben ist. Insbesondere gerät die Proteinquelle in Limitation bzw. einzelne Komponenten derselben (Aminosäuren). Durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, daß mit einer Erhöhung der Nährstoffkonzentration zu Beginn der Fermentation keine Verbesserung erzielbar ist, weil in diesem Fall das Wachstum 3 bis 4 h lang gehemmt ist und damit die Infektionsgefahr wieder ansteigt.

Erfindungsgemäß ist die Aufhebung dieser Nährstofflimitation bei gleichzeitiger Vermeidung von Repressionen des Wachstums aber möglich, wenn die erforderlichen Nährstoffe während der Fermentation zugeführt werden. Dabei ist es notwendig, im angeführten Umfang die C-Quelle zu ergänzen und im angepaßten Verhältnis dazu auch die Proteinkomponente. Der C-Spiegel dient der Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes und dem Zellaufbau, während eine

227965 8

7

und länger aufrechterhält.

Es wurde weiter gefunden, daß die Zugabe der Nährstoffe in kontinuierlicher Weise in der logarithmischen Wachstumsphase, vorzugsweise ab 2. Fermentationsstunde, erfolgen kann. Jedoch bewirkt eine impulsförmige Zudosierung im Abstand von 2 h, vorzugsweise beginnend mit der 2. Fermentationsstunde, einen gleich guten Effekt.

Als für die Grundzusammensetzung von Nährlösung und Produktionsmedium günstig haben sich Maisstärke oder Stärkehydrolysate, Maisquellwasser oder daraus hergestellte Hydrolysate, Hefeextrakt oder Trockenhefe, NaCl und CaCl₂ erwiesen. Eine Zugabe von Phosphaten zur Erhöhung der Pufferwirkung während der Sterilisation ist vorteilhaft. Rapsöl sowie Essigsäure sind im allgemeinen nicht erforderlich.

Als Entschäumer können handelsübliche Silikonöle oder Pflanzenöle (z. B. auch Rapsöl) verwendet werden (0,1%).

Als Zusatznährstoffe für das Produktionsmedium werden hauptsächlich Maisstärke, Stärkehydrolysate und Maisquellwasser eingesetzt. Die Menge der zusätzlich verabreichten Nährstoffe muß - wie bereits ausgeführt - bis zum Ende der Fermentation das Doppelte bis 1,5fache der Ausgangskonzentration erreichen. Es zeigt sich, daß nach diesem Vorgehen die Biomassekonzentration gegenüber dem Verfahren des WP 117 083 erheblich ansteigt. Die Enzymsynthese wird deutlich erhöht und erreicht z. B. bei einer Fermentationsdauer von 16 bis 24 h Werte von 10 bis 12 TE/ml Nährlösung gegenüber 6 TE/ml entsprechend dem Stand der Technik.

* Eine Limitation der Nährstoffe äußert sich u. a. in der Atmungsaktivität der Kultur. Unter konstanten Belüftungsverhältnissen steigt nach Erreichen limitierender Substratkonzentration der Sauerstoffpartialdruck im Fermentor an, d. h. die Atmung verlangsamt sich. Zugaben von Gemischen aus Kohlenhydraten und Proteinen bewirken dann eine sofortige erneute Zunahme des O₂-Verbrauches infolge weiteren Wachstums bzw. der verstärkten Enzymsynthese. Das kräftige

Wachstum begünstigt außerdem die Stabilität des Verfahrens gegenüber äußeren schädlichen Einflüssen, z. B. Infektionen.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Ein 1 l-Rundkolben, der mit Stutzen für die Aufnahme eines O₂-Sensoirs, für die Zuführung von steriler Luft, für die Abfuhrung der Luft und für die Beimpfung versehen ist, wird mit 800 ml Nährlösung folgender Zusammensetzung befüllt und sterilisiert:

Stärkehydrolysenprodukt (SHP)	1,00 Masse-%
Maisquellwasserhydrolysat (ca. 7 % Gesamtproteingehalt)	5,00 Masse-%
NaCl	0,10 Masse-%
CaCl ₂	0,05 Masse-%

Der Inhalt des Kolbens wird mit einem Magnetührer durchmischt, auf 50 °C temperiert und durch Einleiten von Luft mit Sauerstoff gesättigt. Aus einer homogenisierten Sporensuspension der Mutante IMET 9515, die durch 20ständige Bebrütung von Schrägkulturen auf einem Maisquellwasser-Stärke-Medium bei 56 °C und nach Abschwemmung mit einer 0,01 %igen Tween-80-Lösung erhalten wurde, werden 10⁷ Sporen/ml Nährlösung, d. h. 8 · 10⁹ Sporen, in den Kolben eingeimpft. Anschließend wird der Kolben luftdicht verschlossen. Unmittelbar nach Beimpfung beginnt die Atmung der Sporen, was an der Abnahme der O₂-Konzentration feststellbar ist (Fig. 1). Nach etwa 85 min ist die O₂-Konzentration (Kurve 1) im Kolben auf 30 % abgesunken und es wird über eine Regeleinrichtung Luft zugeführt, so daß dieser Wert bis zu einer Zeit von 120 min aufrechterhalten werden kann. Das Auswachsen von Keimschläuchen aus den Sporen beginnt etwa

227965 8

9

40 min nach Beimpfung; nach ca. 100 min sind 100 % der Sporen gekeimt (Kurve 2). Mittels Kontrolle der optischen Dichte kann das beginnende Wachstum nachgewiesen werden (Kurve 3). Nach 120 min wird die Kultur in einen Fermentor überimpft und hier setzt sich das Wachstum nahezu verzögerungsfrei fort.

Beispiel 2

Ein 30 l-Fermentor wird mit 20 l Produktionsmedium der Zusammensetzung

Stärkehydrolysenprodukt (SHP)	1,0 Masse-%
Maisquellwasserhydrolysat (ca. 7 % Gesamtproteininhalt)	5,0 Masse-%
NaCl	0,1 Masse-%
CaCl ₂	0,05 Masse-%

befüllt und sterilisiert. Die Beimpfung erfolgt mit einer Vorkultur gemäß Beispiel 1. Die Fermentationstemperatur beträgt 50 °C, der Rührer hat eine Drehzahl von 300 Umdrehungen min⁻¹, es werden 300 l Luft/h zugeführt. Als Entschäumer werden vor Beimpfung 10 ml Silikonöl oder Rapsöl zugesetzt. 2 h nach Fermentationsbeginn erfolgt die kontinuierliche Zuführung von Nährstoffen, bestehend aus

Stärkehydrolysenprodukt (SHP)	1,0 Masse-%
Maisquellwasserhydrolysat (ca. 7 % Gesamtproteininhalt)	5,0 Masse-%,

und zwar in einer Menge von 2,5 ml/min. Die Dosierung wird bis zum Ende der Fermentation nach 26 h fortgesetzt. Fig. 2 zeigt das Ergebnis im Vergleich zu einer Fermentation ohne Nährstoffzuführung (Grundmedium obiger Zusammensetzung). Die maximale Biomassekonzentration steigt gegenüber dem Kontrollversuch (Kurve 1) von 1,7 mg/ml auf ca. 3,5 mg/ml an (Kurve 2). Die Enzymsynthese verläuft mit deutlich erhöhter Bildungsrate und erreicht gegenüber der

227965 8

10

Kontrolle mit 4 TE/ml Nährösung (Kurve 3) einen Wert von etwa 10 TE/ml (Kurve 4).

Beispiel 3

Ein 30-l-Fermentor wird gemäß Beispiel 2 mit 20 l Produktionsmedium vorbereitet und mit einer Vorkultur gemäß Beispiel 1 beimpft. Die Fermentationsparameter entsprechen denjenigen von Beispiel 2. Nach 2, 4, 6, 10 und 15 h werden jeweils 200 ml Maisquellwasserhydrat zugeführt. Fig. 3 zeigt das Ergebnis. Während die Enzymsbildung in der Kontrolle bei 4 TE/ml Medium liegt, steigt sie bei der Zuführung von Proteinkomponenten auf ca. 10,5 TE/ml (Kurve 2). Die registrierten Werte des Sauerstoffpartialdruckes im Fermentor (Kurve 3) lassen nach der 3., 4. und 6. Nährstoffgabe deutlich die Beschleunigung der Atmung erkennen.

Beispiel 4

Ein 30 l-Fermentor wird mit 20 l Produktionsmedium der Zusammensetzung

Maisstärke	1,0 Masse-%
Maisquellwasser (50 %ig)	1,0 Masse-%
Trockenhefe	0,03 Masse-%
Magermilchpulver	0,05 Masse-%
NaCl	0,5 Masse-%
CaCl ₂	0,05 Masse-%

gemäß Beispiel 2 vorbereitet und mit einer Vorkultur gemäß Beispiel 1 beimpft. Die Rührerdrehzahl beträgt 400 Umdrehungen min⁻¹, es wird Luft mit 300 l/h zugeführt, die Fermentationstemperatur beträgt 50 °C. 2h nach Beginn der Fermentation erfolgt die kontinuierliche Zuführung von zusätzlichen Nährstoffen, bestehend aus

Stärkehydrolysenprodukt (SHP)	1,0 Masse-%
Maisquellwasserhydrolysat (ca. 7 % Gesamtproteingehalt)	5,0 Masse-%

227965 8

11

in einer Menge von 2,5 ml/min. Die Dosierung wird bis Fermentationsende (24 h nach Versuchsbeginn) fortgesetzt. Die Abhängigkeit der Enzymsbildung (Aktivität) von der Zeit ist in Fig. 4 dargestellt. Sie erreicht nach 24 h 10,8 TE/ml Produktionsmedium.

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Thermitase durch Anzucht, Vorkultivierung und Kultivierung von Mikroorganismen des Stammes *Thermoactinomyces vulgaris* und/oder seiner Mutante - hinterlegt in der zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena unter IMET 9512 und für die Mutante IMET 9515 - dadurch gekennzeichnet, daß man zur Vorkultivierung eine eingesetzte mit Sauerstoff gesättigte Nährlösung mit Sporen beimpft und die Auskeimung im hermetisch verschlossenen Gefäß bei Absinken des Sauerstoffpartialdruckes auf 20 bis 40 % des Sauerstoffpartialdruckes bei Sättigung, vorzugsweise auf 30 %, vornimmt, den gewünschten Sauerstoffpartialdruck bis zur vollständigen Auskeimung der Sporen durch Einleiten von Luft aufrecht erhält, die Vorkultur danach in einen Fermentor mit dem Produktionsmedium überführt und die Fermentation durchführt, wobei man während der Fermentation weitere Mengen von Nährstoffen zuführt.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß man im Produktionsmedium Maisstärke, Maisquellwasser, Trockenhefe, Magermilchpulver, Natriumchlorid und Kalziumchlorid einsetzt.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man Stärkehydrolysat und/oder Maisquellwasserhydrolysat einsetzt.
4. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß man den gewünschten Sauerstoffpartialdruck im Vorkulturgefäß 2 bis 4 h, vorzugsweise 2 h, beibehält.
5. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man während der Fermentation Maisstärke oder Stärke-

227965.8

13

Z

hydrolysate und/oder Maisquellwasser oder Maisquellwasserhydrolysate in einer solchen Menge zuführt, die dem Doppelten bis 1,5fachen der Menge des Ausgangsnährmedium entspricht.

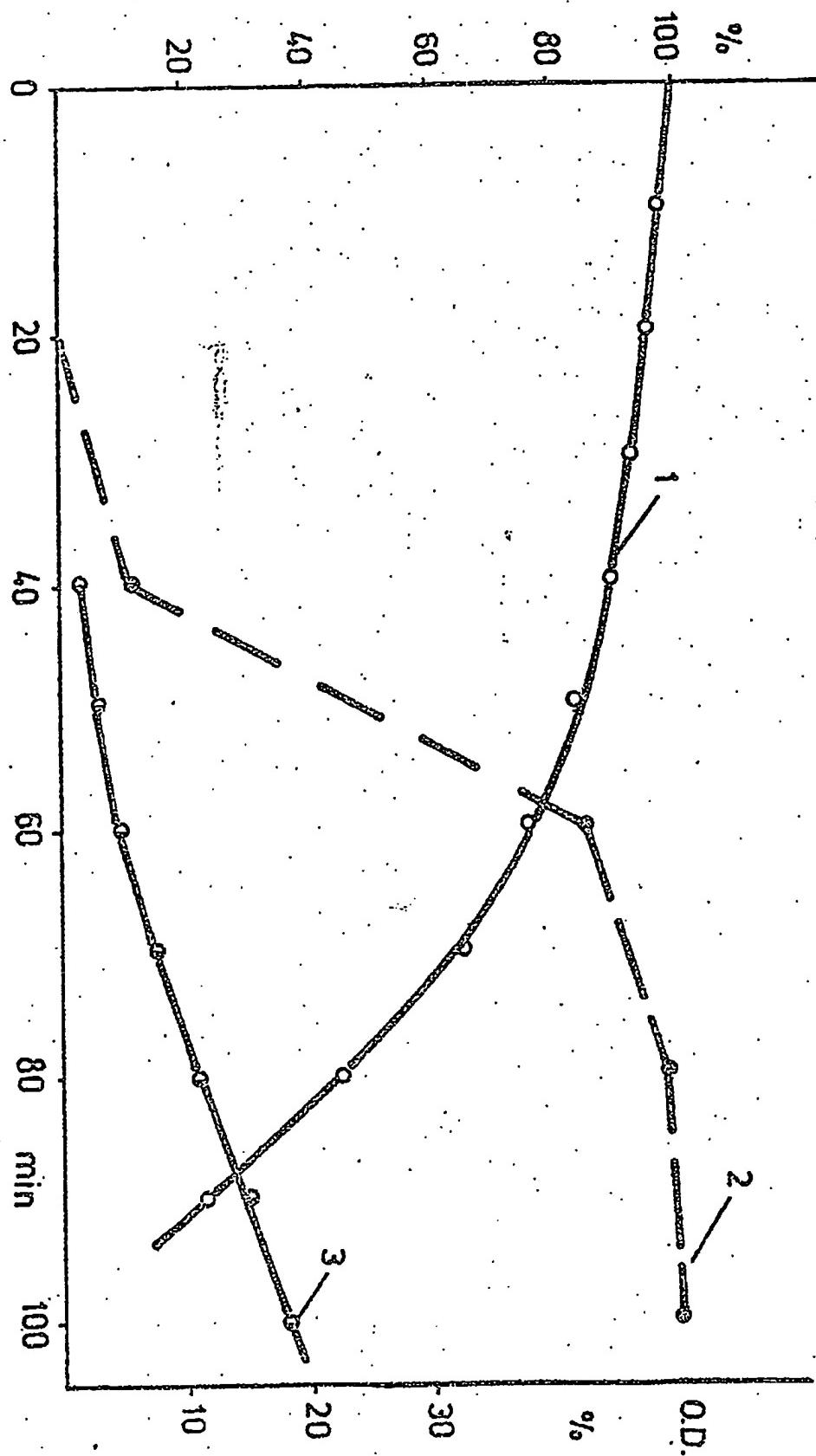
6. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nährstoffe kontinuierlich oder in Etappen zuführt, wobei man 2 bis 6 h, vorzugsweise 2 h, nach Überführung der Vorkultur in den Fermentor beginnt.

Hierzu 4 Seiten Zeichnungen

27.9.63

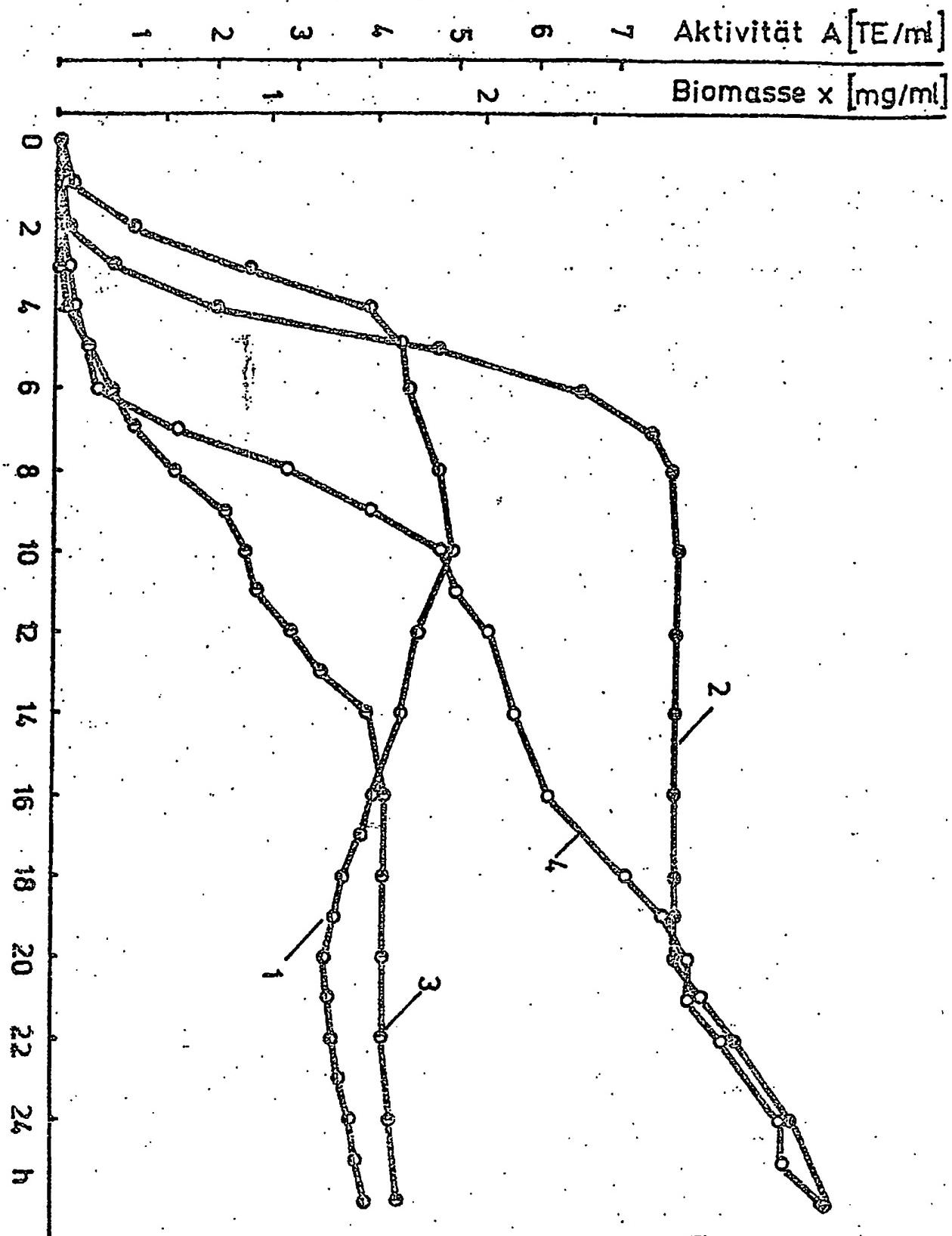
Sauerstoffkonzentration, Keimrate

14



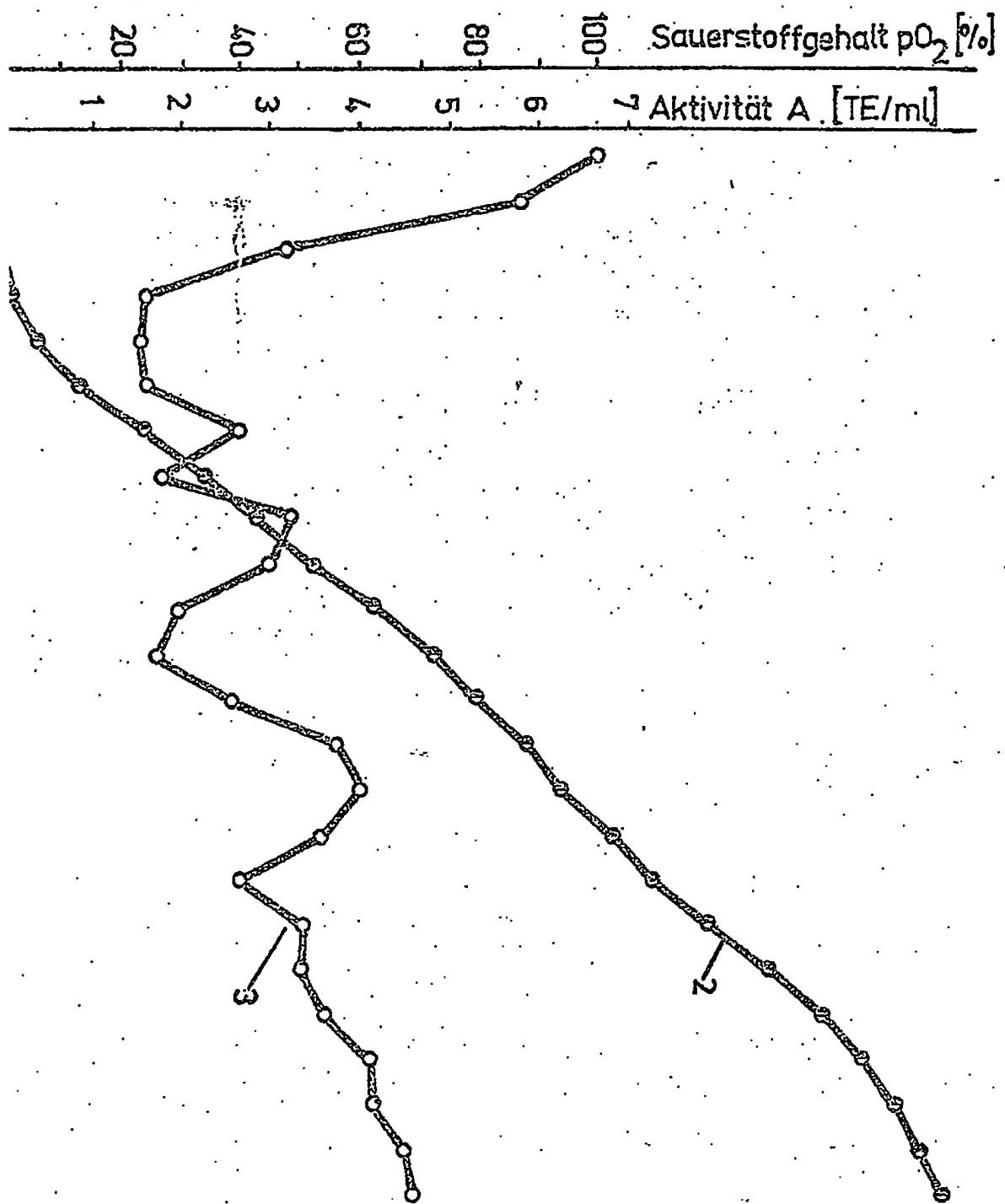
227 935 8

15



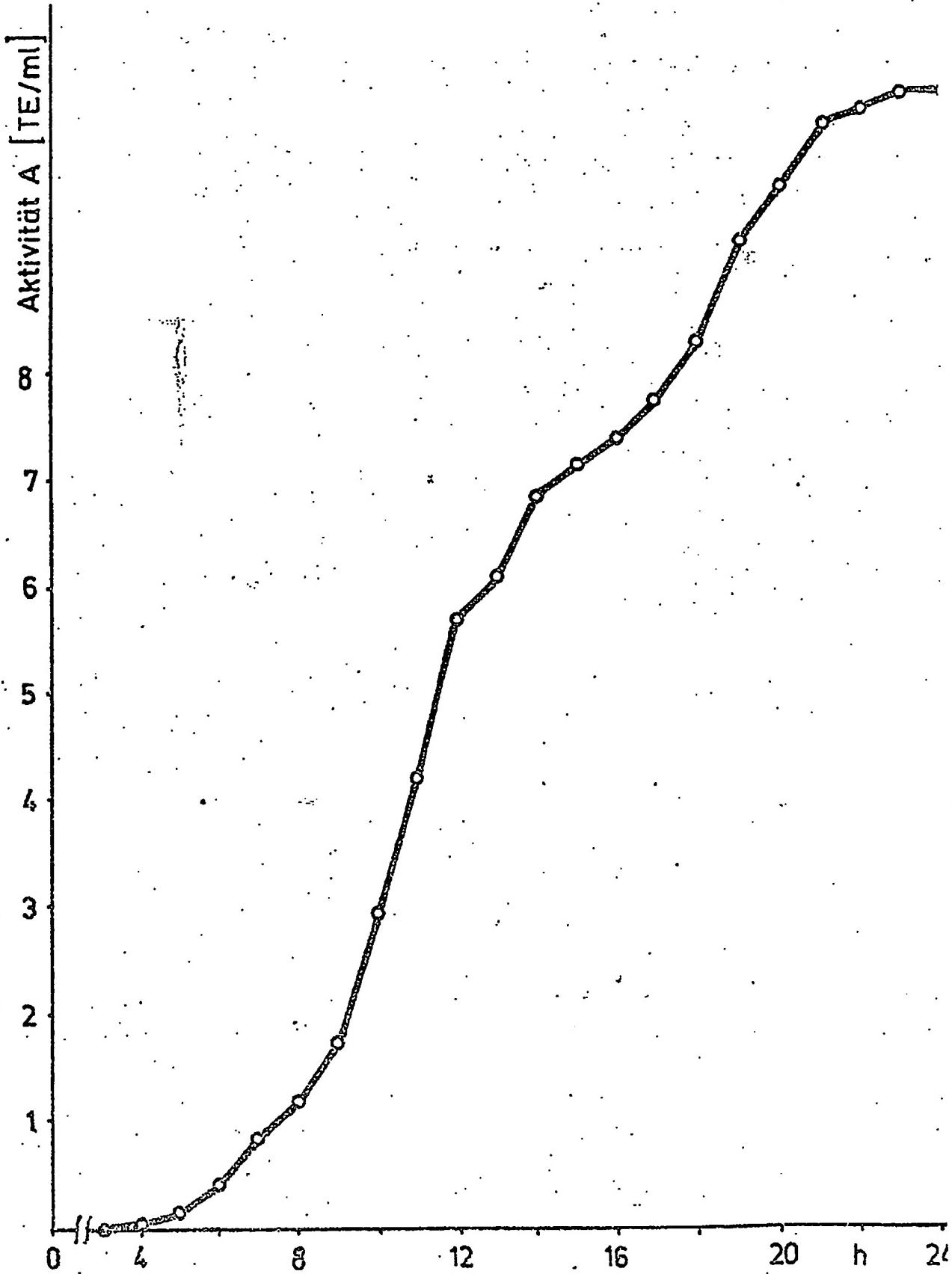
227 965 8

16



227965 8

17



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.